

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ³ : C07H 21/00; C12N 15/00 G01N 33/50	A1	(11) Numéro de publi (43) Date de publicat	02277 07.83)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR82/00223	(74) Mandataires raud, 84, r	88	Plasse- européen). US.
(22) Date de dépôt international: 29 décembre 1982 (29.12.82)	(81) Etats désigné péen), CH GB (brevet		
(31) Numéro de la demande prioritaire: 81/24443	Publiée Avec rappor		
(32) Date de priorité: 29 décembre 1981 (29.12.81)			
(33) Pays de priorité: FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTI- TUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR).			39
(72) Inventeurs: et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 207, rue de Vaugirard, F-75015 Pa- ris (FR). VINCENT, Christian [FR/FR]; 24, rue du Hameau, F-75015 Paris (FR). TCHEN, Paul [FR/FR]; 18, rue du Télégraphe, F-92000 Nanterre (FR).			

(54) Title: DNA FRAGMENTS MARKED AT LEAST AT ONE OF THE ENDS THEREOF BY MODIFIED RIBO-
NUCLEOTIDES RECOGNIZABLE BY RELATED MOLECULES AND METHOD FOR ANALYZING
SUCH DNA FRAGMENTS

(54) Titre: FRAGMENT D'ADN MARQUÉ À L'UNE AU MOINS DE LEURS EXTREMITÉS PAR DES RIBONU-
CLEOTIDES MODIFIÉS RECONNAISSABLES PAR DES MOLECULES AFFINES ET PROCÉDE
POUR RÉALISER UNE ANALYSE DE TELS FRAGMENT D'ADN

(57) Abstract

Method for analyzing DNA sequences. It comprises the fixing at one of the ends of such DNA a ribonucleotide carrying a molecule covalently fixed and carrying a modification group which may be coupled with an enzyme, allowing a further visualization thereof in presence of a terminal DNA transferase, treating said DNA with different chemical agents allowing to operate differential cleavages within such DNA at the basis, which are also of respectively distinct natures, collecting and separating the DNA fragments carrying the visualizable groups in a system allowing to sort them by the size, and determining the unmodified terminal nucleotides of said DNA fragments, considering the nature of the chemical agents used for the cleavage at their respective levels.

(57) Abrégé

Procédé d'analyse de séquences d'un ADN. Il consiste à fixer à l'une des extrémités de cet ADN un ribonucléotide portant une molécule fixée de façon covalente et portant un groupe de modification couplable avec une enzyme, permettant leur visualisation ultérieure en présence d'un ADN terminal transférase, à traiter cet ADN avec des agents chimiques distincts permettant d'opérer des clivages différentiels au sein de cet ADN au niveau de bases, également de natures respectivement distinctes, à recueillir et à séparer les fragments d'ADN portant les groupes visualisables dans un système permettant de les trier par ordre de tailles, et à déterminer les nucléotides terminaux non modifiés de ces fragments d'ADN, eu égard à la nature des agents chimiques utilisés pour le clivage à leurs niveaux respectifs.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	LI	Liechtenstein
AU	Australie	LK	Sri Lanka
BE	Belgique	LU	Luxembourg
BR	Brsil	MC	Monaco
CF	République Centrafricaine	MG	Madagascar
CG	Congo	MR	Mauritanie
CH	Suisse	MW	Malawi
CM	Cameroun	NL	Pays-Bas
DE	Allemagne, République fédérale d'	NO	Norvège
DK	Danemark	RO	Roumanie
FI	Finlande	SE	Suède
FR	France	SN	Sénégal
GA	Gabon	SU	Union soviétique
GB	Royaume-Uni	TD	Tchad
HU	Hongrie	TG	Togo
JP	Japon	US	Etats-Unis d'Amerique
KP	République populaire démocratique de Corée		

Fragments d'ADN marqués à l'une au moins de leurs extrémités par des ribonucléotides modifiés reconnaissables par des molécules affines et procédé pour réaliser une analyse de tels fragments d'ADN.

L'invention est relative à des fragments d'ADN marqués à l'une au moins de leurs extrémités par des fragments de nucléotides modifiés, plus particulièrement de ribonucléotides modifiés reconnaissables par des molécules affines, et à un procédé pour réaliser une analyse de séquence de tels fragments.

Parmi les techniques d'analyse des séquences de nucléotides contenues dans un ADN, on mentionnera à titre principal la méthode dite de MAXAM & GILBERT (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 74, N° 2, pp. 560-564, février 1977), méthode qui consiste à soumettre l'ADN à analyser, à des réactions de clivages différentiels au niveau des bases guanine et adénine, à des clivages à proportions égales au niveau des bases cytosine et thymine et enfin à des clivages au niveau des seules bases cytosine. Cette méthode implique cependant que l'ADN étudié ait auparavant été marqué à l'une de ses extrémités par un marqueur radioactif, notamment le ^{32}P , d'où la possibilité, après séparation des fragments obtenus après les susdites opérations de clivage, notamment par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, de reconstituer la séquence d'enchaînement des différents nucléotides dont était initialement constitué l'ADN étudié, plus particulièrement à partir des images autoradiographiques qui peuvent être formées sur un film impressionnable appliqué sur le gel.

Les difficultés qu'implique la révélation autoradiographique des produits des clivages sur la plaque de gel sont bien connues. En raison de la diffusion du rayon-

nement des isotopes marqués dans toutes les directions de l'espace, une résolution satisfaisante des différentes bandes de migration dans le gel suppose l'utilisation de plaques extrêmement minces. En général, l'épaisseur de ces plaques ne dépasse pas 0,3 mm d'épaisseur. L'utilisation de plaques de gel plus épaisses entraînerait une diminution rapide du pouvoir de résolution du procédé autoradiographique. L'utilisation de la radioactivité en elle-même n'est pas non plus sans dangers.

10 L'invention a pour but de remédier à ces difficultés, notamment de fournir un procédé de modification des ADN dont la séquence doit être étudiée, rendant plus aisée la détection ultérieure des fragments d'ADN susceptibles d'être obtenus par un procédé d'analyse de séquences
15 (tel qu'il a été rappelé plus haut, ou par tout autre procédé susceptible de conduire à des résultats analogues).

L'ADN modifié selon l'invention est caractérisé par le fait qu'un oligomère de ribonucléotides modifiés, de préférence un ribonucléotide modifié unique, est fixé
20 à l'une au moins de ses extrémités, la modification du ribonucléotide lui-même consistant en une molécule chimique fixée de façon covalente à ce ribonucléotide et portant au moins un groupe non engagé dans la liaison covalente susdite et couplable directement ou indirectement avec une
25 molécule ou un produit ayant une affinité spécifique pour ce groupe et permettant par conséquent la reconnaissance sélective de l'ADN modifié.

En particulier, ce groupe permet une liaison affine chimique ou immunologique avec une molécule ou un
30 produit lui-même directement révélabile ou susceptible d'être révélé à son tour par couplage avec un autre produit révélateur. En outre, ce groupe est tel qu'il ne modifie pas la capacité de ce ribonucléotide à être fixé à l'extrémité d'un ADN, en présence d'une ADN-transférase
35 terminale, lorsqu'il est mis en contact avec cet ADN, dans des conditions permettant la fixation d'un ou de plusieurs ribonucléotides sur cette extrémité.

L'invention concerne également un procédé pour



obtenir un tel ADN modifié, ce procédé consistant à traiter l'ADN à étudier avec un tel ribonucléotide modifié, en présence d'au moins celui des ribonucléotides normalement susceptible de s'apparier dans un ADN avec le ribonucléotide en question, porteur ou non d'un tel groupe de modification, et d'une ADN-terminale transférase, le cas échéant, et lorsque le produit de fixation à l'extrémité de l'ADN résultant de ce traitement consiste en un oligomère de nucléotides modifiés, à éliminer les ribonucléotides modifiés de cet éventuel oligomère, à l'exception du ribonucléotide directement fixé au déoxyribonucléotide terminal d'extrémité de l'ADN en question. Cette élimination est de préférence faite au moyen d'une base alcaline, notamment de la soude, dans des conditions permettant la séparation des liaisons que forment entre eux les ribonucléotides dans ce fragment d'oligomère.

On peut obtenir de façon en soi connue, à partir d'un ADN portant à ses deux extrémités des ribonucléotides eux-mêmes modifiés, comme défini ci-dessus (ou à partir d'un ADN n'en portant qu'à l'une de ses extrémités), des fragments d'ADN plus petits, soit par action d'agents chimiques susceptibles de provoquer des clivages, notamment au niveau de nucléotides déterminés, soit, de préférence, par action d'endonucléases, notamment d'enzymes de restriction appropriées, dans la mesure où l'ADN correspondant comporte le site de restriction correspondant.

Le traitement de ce fragment d'ADN avec plusieurs enzymes de restriction permet, par récupération des différents fragments marqués à la même extrémité, l'établissement éventuel d'une carte de restriction de cet ADN.

Lorsqu'à une certaine enzyme de restriction correspond un site de restriction unique, le traitement dudit fragment d'ADN par cette enzyme permet l'obtention de fragments de longueur déterminée, se prêtant à une analyse de la séquence des déoxyribonucléotides dont ils sont formés.

En effet, l'invention concerne aussi, dans l'une de ses applications préférées, un procédé comprenant les étapes qui consistent à traiter un ADN ainsi marqué à l'une

de ses extrémités par un ribonucléotide modifié comme ci-dessus défini, avec des agents chimiques permettant d'opérer au sein de cet ADN des clivages différentiels au niveau de certaines bases, notamment celles qui ont
5 été décrites par MAXAM & GILBERT dans l'article déjà mentionné plus haut, à recueillir et à séparer des fragments d'ADN dans un système permettant de les trier par ordre de tailles, et à les faire réagir avec des réactifs permettant la réalisation d'un couplage des
10 groupes chimiques portés par les ribonucléotides terminaux de ceux des fragments qui en portent, avec une molécule ou un produit ayant une affinité sélective à l'égard du groupe chimique de modification desdits ribonucléotides terminaux.

15 Les ribonucléotides modifiés fixés à l'extrémité des ADN concernés sont principalement dérivés :
- de l'acide adénosine 5'-triphosphorique (ATP),
- de l'acide guanosine 5'-triphosphorique (GTP),
- de l'acide cytidine 5'-triphosphorique (CTP) et
20 - de l'acide uridine 5'-triphosphorique (UTP).

Le groupe chimique lié de façon covalente à ces ribonucléotides peut revêtir les formes les plus diverses, dès lors qu'il possède un groupe permettant son couplage avec des substances affines permettant sa
25 révélation, de préférence sous forme directement visualisable, et qu'il n'empêche pas une ADN-transférase terminale d'assurer la fixation des ribonucléotides modifiés obtenus aux extrémités d'un ADN.

Parmi les groupes chimiques préférés susceptibles d'être fixés sur les bases des susdits ribonucléotides, on mentionnera tout groupe susceptible
30 d'être reconnu spécifiquement par une autre molécule ou par un produit, lui-même aisément détectable, de préférence par une méthode de visualisation.

35 Cette autre molécule ou cet autre produit consiste par exemple en une enzyme, dont la présence peut être révélée par l'action qu'elle est susceptible d'exercer sur un substrat, de préférence un substrat

donnant lieu à des réactions de coloration ou de décoloration, ou plus généralement encore de modification de spectres d'absorption respectivement décelables par colorimétrie ou spectrophotométrie. On peut naturellement
5 avoir recours à des molécules ou produits donnant lieu à des réactions de fluorescence, à des modifications de densité optique, etc., par exemple des produits comprenant des groupes dérivés de l'aminofluorène, du chlorure de dansyle, de la rhodamine, etc..

10 Parmi les groupes de modification appropriés, on mentionnera les groupes chimiques dont est connue l'affinité pour un autre type de molécule chimique. Parmi ces groupes de modification chimique, on peut mentionner la biotine ou l'avidine, dont on connaît les affinités réciproques, les groupes dérivés de l'une de ces molécules
15 pouvant servir à la modification du ribonucléotide choisi et l'autre de molécule couplable avec un réactif marqué par une enzyme ou susceptible d'être fixée à une enzyme, par exemple dans les conditions décrites dans le brevet
20 n° 78 10975 de l'INSTITUT PASTEUR déposé le 13 avril 1978. Ce réactif consiste par exemple en un anticorps spécifique dirigé contre le groupe de modification ou en une molécule ayant une affinité spécifique pour ledit groupe de modification.

25 Parmi les groupes de modification utiles du ribonucléotide initial, figurent également des antigènes ou haptènes susceptibles d'être reconnus par des anticorps préalablement formés contre ces antigènes ou contre ces haptènes, plus particulièrement lorsque ceux-ci ont été
30 fixés au préalable sur une macromolécule support, telle qu'une sérum-albumine ou un polypeptide, par exemple une polylysine. Parmi ces antigènes ou haptènes, on peut citer la biotine et l'avidine elles-mêmes, des groupes acétylaminofluorène, des peptides, hormones ou prostaglandines,
35 notamment ceux auxquels correspondent des antisérums ou anticorps spécifiques, des lectines, dont est connue la capacité à être couplées à des enzymes permettant leur révélation, notamment des peroxydases, β -galactosidases, etc... De tels sérums ou anticorps sont disponibles dans

le commerce.

Mais la molécule ou le produit présentant des caractéristiques d'affinité vis-à-vis du groupe de modification susdit, sert éventuellement aussi seulement de relais vis-à-vis d'une autre molécule ou d'un autre produit susceptible d'être visualisé à son tour, notamment dans les conditions sus-indiquées ; par exemple le produit présentant les caractéristiques d'affinité, vis-à-vis du groupe de modification susdit, est constitué par un anticorps lui-même non marqué, mais reconnaissable à son tour par des anticorps contre lui-même, ces derniers anticorps étant eux-mêmes couplés à l'enzyme susceptible d'agir sur un substrat spécifique, dans les conditions classiques en matière de dosage immunoenzymatique.

D'une façon générale, le groupe de modification du ribonucléotide est constitué par toute molécule ou produit chimique fixable sur un ribonucléotide et ensuite détectable dans les conditions qui ont été indiquées, dans la mesure où il ne perturbe pas la capacité du nucléotide modifié obtenu à être attaché à l'extrémité d'un ADN, sous l'action d'une ADN-transférase terminale ; cette propriété est également à la base du test de reconnaissance qui permet d'en constater la réalité, savoir la visualisation effective, notamment dans les conditions sus-indiquées, d'un fragment d'ADN déterminé porteur à l'une au moins de ses extrémités du ribonucléotide modifié par la molécule ou produit étudié, dans la mesure où un tel ADN transformé aura été formé, à l'issue de la réaction du fragment d'ADN correspondant avec le ribonucléotide modifié, en présence d'une ADN-transférase terminale dans des conditions permettant normalement la fixation du même ribonucléotide non modifié ou d'un oligomère de tels ribonucléotides, à l'une au moins des extrémités de ce fragment d'ADN.

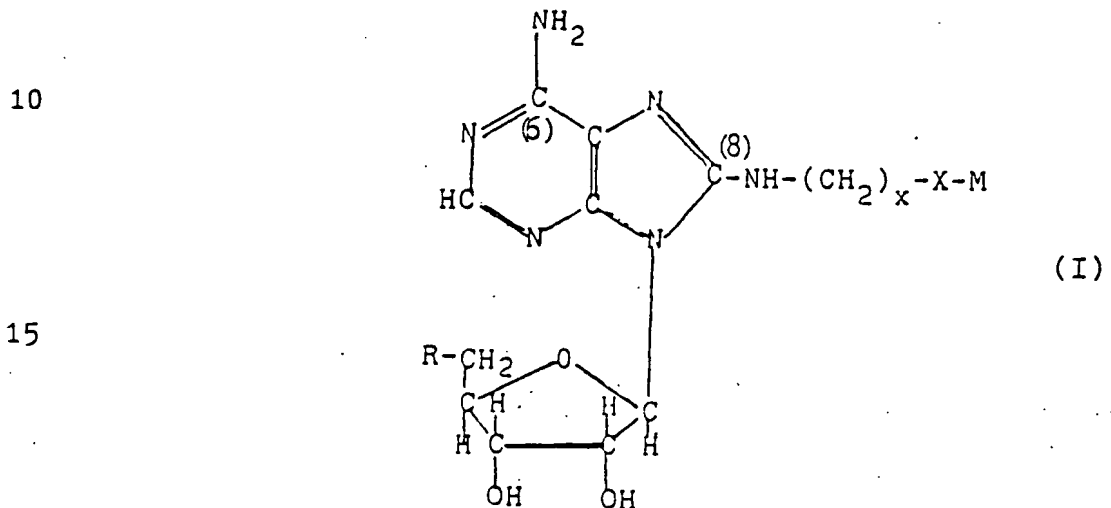
Lorsque le ribonucléotide initial est constitué par l'ATP, le groupe de modification chimique sus-indiqué est fixé sur la position 6, de préférence 8, du groupe adénine.

Cette fixation intervient avantageusement par l'intermédiaire d'un bras du type $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-Y}$, ou $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, dans lequel x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12, et X est un groupe assurant la liaison entre
5 un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe. Les groupes CH_2 du bras susdit peuvent en partie être remplacés par des groupes CO ou NH, à condi-

tion naturellement que ces groupes de remplacement ne soient pas adjacents à des groupes identiques.

Par exemple, si l'on considère le cas de la modification du groupe adénine de l'ATP en sa position 8, le ribonucléotide modifié obtenu peut être représenté par la formule (cas d'un bras du type

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_x-\text{X}-$) :



20 dans laquelle R est un groupe triphosphate, x, X et M ont les significations sus-indiquées. Avantageusement, le groupe X est constitué par un groupe NH ou CO.

Un procédé pour fabriquer le dérivé de formule I, par exemple à partir de l'ATP préalablement bromé en position 8, consiste à le faire réagir dans les

25 conditions appropriées, avec un composé de formule $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_x-\text{X}-\text{Y}$, dans lequel Y représente un radical auquel sera ensuite substitué le groupe M susdit, notamment par la mise en oeuvre d'une réaction de condensation avec une molécule MZ, au cours de laquelle est

30 alors formé le produit de condensation de formule I, avec libération d'une molécule Y-Z.

Lorsque le groupe X est NH, Y est avantagement de l'hydrogène. Lorsque X est CO, Y est avantagement un hydroxyle. Z peut être constitué par tout

35 groupe susceptible d'être détaché de M dans la susdite réaction de condensation, par exemple le fluor lorsque la molécule chimique donneuse du groupe recherché est le

fluoro-1-dinitro-2,4 benzène, ou un hydroxyle

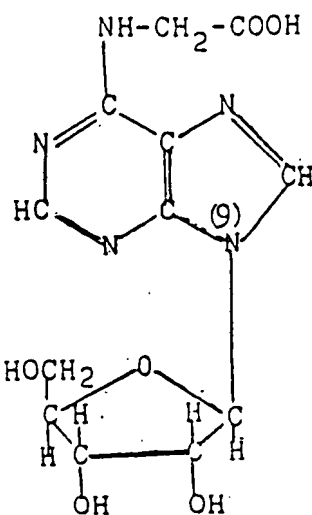
ou de l'hydrogène dans le cas d'un peptide. Dans ce dernier cas, la fixation de ce peptide à l'extrémité du bras susdit peut, lorsque le groupe XY est constitué par un groupe NH_2 ou COOH , être effectué par la
5 mise en oeuvre de réactions de couplage, traditionnelles dans la chimie des protéines, entre groupes carboxyle et amine, respectivement portés par les deux éléments peptidiques distincts à coupler, par exemple par condensation en présence d'un agent de condensation,
10 tel que le dicyclohexyl-carbodiimide ou après formation préalable d'un ester activé à la fonction carboxylique de celui de ces deux éléments peptidiques qui le portent.

La position 8 sur le cycle adénine de l'ATP
15 ne constitue évidemment pas le seul point sur lequel peut se brancher une chaîne porteuse d'un groupe de modification tel qu'il a été défini plus haut. A titre d'exemple, on peut également substituer l'un des atomes d'hydrogène porté par le carbone en position 6 du cycle,
20 adénine par une chaîne porteuse de ce groupe. A titre d'exemple, on mentionnera la possibilité de substitution qui consiste à faire réagir avec l'ATP de l'acide iodoacétique ou un acide organique iodé équivalent, permettant la formation préalable d'un sel quaternaire, faisant intervenir l'azote en position 1, sel qui se transforme ensuite par chauffage en milieu basique à 35°C , à pH légèrement basique, notamment à pH 8, pendant le temps suffisant, par exemple 72 heures, en un produit de substitution de l'un des hydrogènes du groupe NH_2
25 fixé sur le carbone en position 6 du groupe adénine (réaction du type connu sous l'expression "réarrangement de Dimroth").
30

On obtient alors (lorsque l'acide organique iodé est constitué par l'acide iodoacétique) le composé de formule II ci-après :
35

5

10



(II)

15 Ce composé peut ensuite être transformé, par
réaction avec le composé de formule $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$ déjà
défini plus haut, dans des conditions permettant la
liaison chimique entre le groupe carbonyle initialement
contenu dans le groupe carboxyle dans le composé de
20 formule II et le groupe imino appartenant initialement
à la fonction aminée du composé $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$, lequel
peut alors être couplé à son tour avec un composé de
formule MZ, dans les conditions qui ont déjà été défini-
nies plus haut.

25 Il va de soi que tous les éléments qui pré-
cèdent ne visent qu'à illustrer des modes de prépara-
tion particuliers qui permettent de fixer sur l'ATP
un groupe de modification choisi parmi ceux auxquels
correspondent des molécules affines, comme cela a été
défini plus haut.

30 On peut de façon analogue fabriquer des dé-
rivés du GTP, les groupes de modification chimique sus-
définis étant alors fixés dans des conditions ana-
logues sur la position 2 ou de préférence 3 du groupe
guanine du GTP. Les mêmes mécanismes de réaction sont
35 normalement applicables.

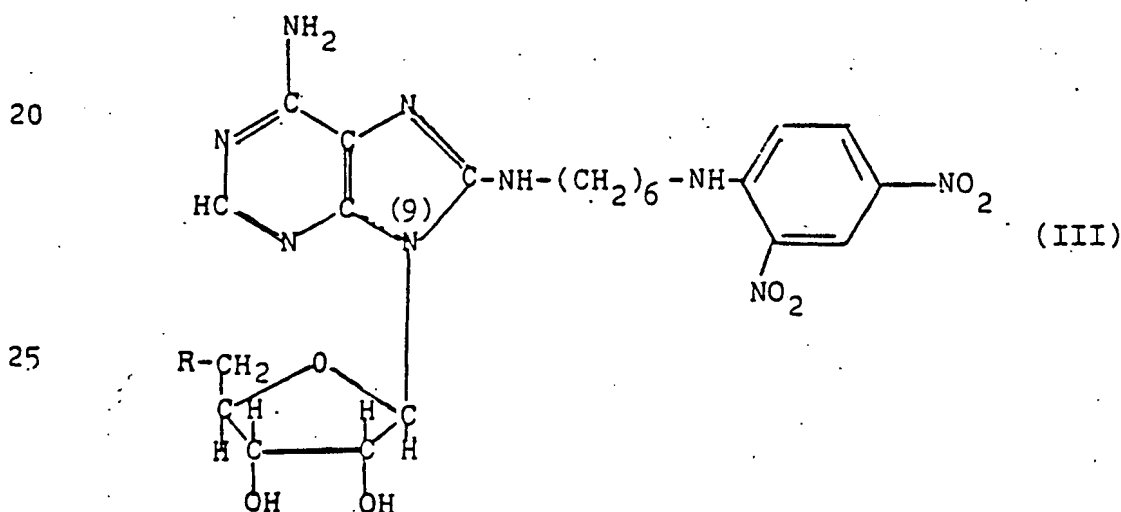
De même, on peut mettre en oeuvre, dans les

applications préférées qui ont été indiquées, de l'UTP ou du CTP modifié par un groupe chimique répondant aux conditions sus-indiquées, en ayant cependant recours au procédé tout à fait différent décrit dans l'article de
 5 P.R. LANGER et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 78, No. 11, p. 6633-6637, novembre 1981).

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description d'exemples de mises en oeuvre préférées de l'invention.

10 Préparation du 8-[N-(dinitro-phényl)-amino-hexyl]-aminoadénosine 5'-triphosphate.

On fait réagit du 8-(aminohexyl)-aminoadénosine 5'-triphosphate avec du fluoro-1-dinitro-2,4-benzène, au sein d'un mélange eau-éthanol 10/1 volumes %, à
 15 pH 8,8, à 40°C, et en présence d'un sel, notamment chlorure, de magnésium. Le produit de réaction finalement obtenu a pour formule :



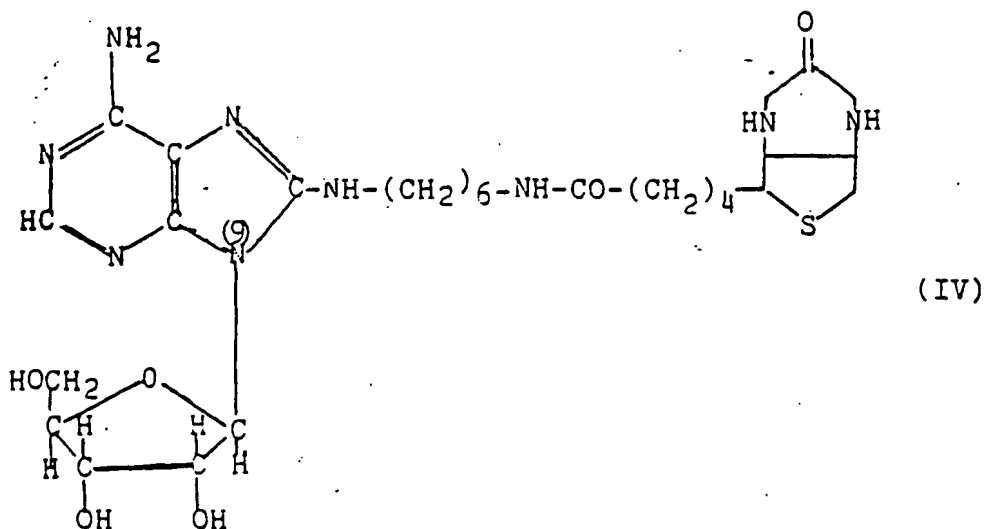
30 On récupère le dérivé de formule III, ci-après dénommé ATP-DNP, après une purification comprenant la fixation du ribonucléotide sur DEAE cellulose, élution avec un gradient de LiCl 0,2 N, pH 5,5, à LiCl 0,5 N, pH 2 et filtration sur tamis moléculaire du
 35 type SEPHADEX G50. Le rendement réactionnel est de 52 %. Les fractions recueillies sont analysées par spectrophotométrie d'absorption de rayonnements de lon-

guez d'onde de 280 et 360 nanomètres respectivement. On recueille celle des fractions dont les densités optiques dans les deux susdits domaines de longueurs d'onde sont dans un rapport (DO_{280}/DO_{360}) égal à 4. Le produit contenu dans cette fraction correspond à celui résultant de la fixation de 1 mole de DNP sur 1 mole d'ATP. Il ne donne également qu'une tache dans un système de chromatographie en couche mince. Le produit de cette fraction est lyophilisé.

Ce produit présente la caractéristique d'être reconnu par des anticorps formés au préalable à l'égard de dinitro-2,4 benzène, qui avait préalablement été fixé sur un support macromoléculaire du type de la sérum-albumine. Des anticorps de ce type sont par ailleurs disponibles dans le commerce.

Préparation du 3-(N-biotinyl-aminohexyl)aminoadénosine 5'-triphosphate.

On condense du 8-(aminohexyl)-amino-adénosine-5'-triphosphate avec le biotinyl-N-hydroxysuccinimide-ester, dans les conditions décrites par LANGER et al, telles qu'appliquées à la fabrication du biotinyl-UTP à partir de la 5-(3-amino)allyluridine. On obtient alors le composé de formule :



Fabrication d'un ADN marqué à ses extrémités par des ribonucléotides modifiés.

5 600 micromoles d'ATP-DNP et 10 microgrammes d'un fragment d'ADN comportant 500 paires de bases sont mis à réagir en présence de 30 unités d'ADN-terminal-transférase à 37°C et pendant 24 heures, au sein d'une solution tampon, dont la composition est la suivante (volume final 200 microlitres):

10 cacodylate de potassium : 100 mM
sérum d'albumine bovine : 1 mg/ml
dithiothreitol : 1 mM
chlorure de cobalt : 1 mM

15 L'ADN retenant à ses extrémités des groupes ATP-DNP est purifié, par passage de la solution sur une colonne du tamis moléculaire commercialisé sous la marque SEPHADEX G 50.

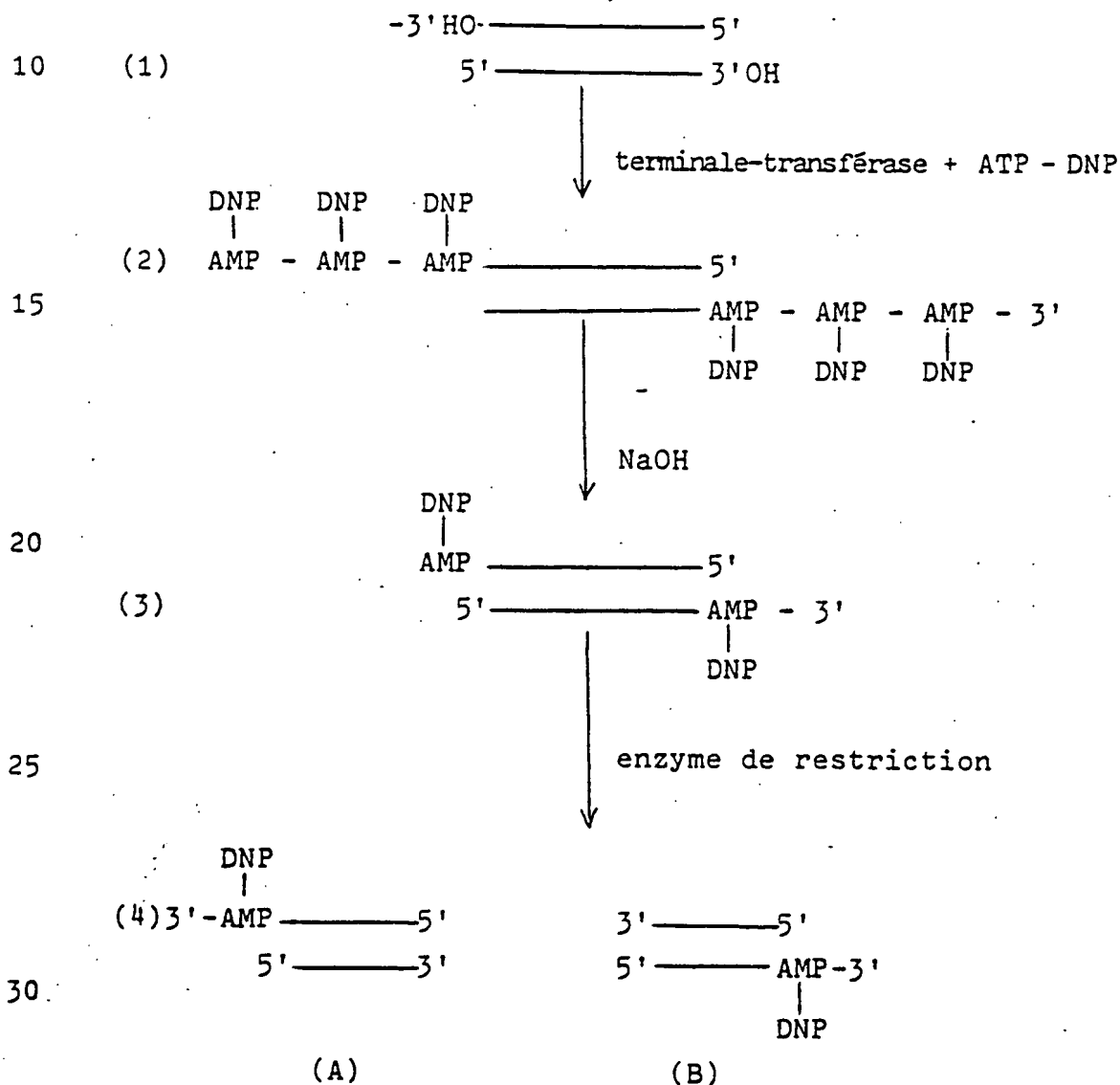
20 Une goutte de cette fraction est déposée sur un filtre de cellulose. Après séchage du filtre, on met celui-ci au contact d'une solution d'anticorps anti-DNP de lapin. L'anticorps non fixé est rincé. Le filtre est ensuite mis au contact d'une solution d'anticorps de lapin liée à de la peroxydase. Après rinçage de l'excès d'anticorps non fixé, on révèle la présence d'anticorps fixés sur le filtre avec une solution d'un
25 substrat pour la peroxydase. Cette solution contient :
- de l'eau oxygénée : 10 µl d'H₂O₂ à 110 volumes,
- de l'acétate de potassium : 9,5 ml 0,05 M, pH 5,1,
- du carbazole: 2 mg pour 0,5 ml de N-N'-diméthylformamide.

30 La présence de l'anti-anticorps de lapin sur le filtrat est alors révélé par la formation d'un précipité brun rouge.

La sensibilité de la méthode est telle qu'elle permet de détecter des quantités extrêmement faibles d'ADN, notamment 380.10^{-4} picomoles.

Application des ADN modifiés conformes à l'invention à l'analyse des séquences de déoxynucléotides qui les constituent.

Les premières étapes de la méthode permettant l'analyse des séquences de nucléotides contenus à l'intérieur d'un ADN déterminé à double-brin sont schématisées ci-après.



L'ADN initial (1) est schématisé par deux traits parallèles comportant l'indication des extrémités respectives 3', 5' de chacun des brins de cet ADN.

Par réaction avec l'ATP-DNP, en présence d'ADN-terminale-transférase, on obtient le fragment

d'ADN modifié représenté en (2), dont les extrémités 3' portent des oligomères d'AMP-DNP (trois motifs AMP-DNP par oligomère, dans le cas de l'exemple considéré ; avec AMP désignant les éléments dérivés du ATP-DMP après l'élimination de deux groupes phosphate par monomère d'ATP-DMP, du fait de l'oligomérisation).

L'ADN ainsi modifié est soumis à une hydrolyse alcaline au sein d'une solution de soude 1 M, à 40 °C, ce grâce à quoi on obtient un ADN modifié, à nouveau récupérable par filtration à travers un tamis moléculaire, ne portant plus à chacune de ses extrémités terminales qu'un seul ribonucléotide modifié (3).

Par action d'une enzyme de restriction, par exemple dans les conditions décrites par MAXAM & GILBERT, on produit deux fragments repérés par A et B en (4). On remarquera que l'on peut évidemment modifier à volonté l'ordre des opérations (2), (3) et (4).

Après isolement et purification par exemple des fragments B, ceux-ci sont répartis en plusieurs lots respectivement soumis aux différentes réactions de clivage différentiel, telles que celles et dans les conditions décrites par MAXAM & GILBERT. Les produits résultant de ces réactions de clivage sélectif sont soumis à des opérations d'électrophorèse sur gel d'acrylamide, dans les conditions décrites par les mêmes auteurs, pour séparer les différents fragments d'ADN, respectivement marqués à leurs extrémités par ordre de tailles, et en différentes bandes.

Conformément à l'invention, on procède ensuite à la révélation des différents fragments marqués par exemple *in situ* dans le gel, par mise en contact de ces derniers avec les solutions d'anticorps, dans les conditions qui ont été indiquées plus haut. On peut aussi transférer au moins en partie les bandes de migrations distinctes sur un filtre de cellulose ou support analogue, par application de ce filtre sur le gel, les différents fragments ou bandes étant alors

déTECTÉS sur le filtre lui-même, par exemple dans les conditions qui ont déjà été indiquées plus haut.

On appréciera que cette méthode extrêmement sensible n'implique plus l'utilisation antérieurement
5 nécessaire de plaques de gel extrêmement minces, puisque la détection peut maintenant s'effectuer par visualisation directe des bandes de fractionnement soit dans le gel, soit sur le filtre.

L'invention concerne naturellement les ribo-
10 nucléotides modifiés eux-mêmes lorsqu'ils sont nouveaux. Tel est en particulier le cas pour les ribonucléotides modifiés dans les conditions sus-indiquées, lorsqu'ils sont dérivés de l'ATP.

Comme il va de soi et comme il résulte
15 d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes.

REVENDICATIONS

1 - ADN modifié par un oligomère de ribonucléotides modifiés, de préférence un ribonucléotide modifié unique, fixé à l'une au moins de ses extrémités, la modification du ribonucléotide lui-même consistant en une
5 molécule chimique fixée de façon covalente à ce ribonucléotide et portant au moins un groupe non engagé dans la liaison covalente susdite et couplable directement ou indirectement avec une molécule ou un produit ayant une affinité spécifique pour ce groupe et permettant sa reconnaissance, ledit groupe étant en outre tel qu'il n'empêche pas un ribonucléotide qui le porte à être fixé à l'extrémité d'un ADN, en présence d'une ADN-transférase terminale, lorsqu'il est mis en contact avec cet ADN, dans des conditions permettant la fixation d'un ou de plusieurs ribonucléotides sur cette extrémité.
15

2 - ADN modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification est susceptible d'être reconnu spécifiquement et directement par une autre molécule ou par un produit, lui-même aisément détectable, par une méthode de visualisation.
20

3 - ADN modifié selon la revendication 2, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification est constitué par un antigène ou un haptène susceptible d'être reconnu par un anticorps préalablement formé contre cet antigène ou contre cet haptène.
25

4 - ADN modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification sert de relais vis-à-vis d'une autre molécule ou d'un autre produit susceptible d'être visualisé à son tour.

30 5 - ADN modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification ou, selon le cas, la susdite molécule relais, est couplable chimiquement avec une molécule affine marquée par une enzyme ou immunologiquement avec
35 un anticorps marqué par une enzyme et ayant une affinité

sélective pour ledit groupe de modification ou la susdite molécule relais.

6 - ADN modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par la fixation à l'une au moins de ses extrémités d'au moins un groupe ribonucléotide modifié, dérivé de l'ATP modifié par un groupe de modification fixé de façon covalente sur la position 6, ou de préférence 8, de son groupe adénine, par l'intermédiaire d'un bras du type $-NH-(CH_2)_x-X$, ou $-CO-(CH_2)_x-X$, dans lequel x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12, et X est un groupe assurant la liaison entre un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe.

7 - ADN modifié selon la revendication 6, caractérisé en ce que les groupes CH_2 du bras susdit peuvent en partie être remplacés par des groupes CO ou NH, à condition naturellement que ces groupes de remplacement ne soient pas adjacents à des groupes identiques.

8 - ADN modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification comprend un groupe dérivé de la biotine, de l'avidine ou un groupe dinitro-2,4-phényle.

9 - Procédé de modification d'un ADN comprenant les étapes consistant à traiter ledit ADN avec un ribonucléotide, portant un groupe de modification tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, en présence d'au moins celui des ribonucléotides normalement susceptible de s'apparier dans un ADN avec le ribonucléotide en question, porteur ou non d'un tel groupe de modification, et d'une ADN-terminale transférase, puis le cas échéant, et lorsque le produit de fixation à l'extrémité de l'ADN résultant de ce traitement consiste en un oligomère de nucléotides modifiés, à éliminer les ribonucléotides modifiés de cet éventuel oligomère, à l'exception du ribonucléo-

tide directement fixé au déoxyribonucléotide terminal d'extrémité de l'ADN en question, de préférence par l'action d'une base alcaline, notamment de la soude, dans des conditions permettant la séparation des liaisons que forment entre eux les ribonucléotides dans ce fragment d'oligomère.

10 - Application de la modification de l'ADN à l'une de ses extrémités par un ribonucléotide portant un groupe de modification tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, à l'obtention d'une carte de restriction de cet ADN par action des enzymes de restriction correspondantes, et par récupération, tri et comparaison des tailles des fragments obtenus et portant tous le même ribonucléotide modifié à l'une de ses extrémités.

11 - Application de la modification de l'ADN à l'une de ses extrémités par un ribonucléotide portant un groupe de modification tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, à la réalisation d'une analyse de la séquence de nucléotides dont est constitué cet ADN, par un procédé comprenant les étapes consistant à traiter cet ADN avec des agents chimiques permettant d'opérer au sein de cet ADN des clivages différentiels au niveau de certaines bases, à recueillir et à séparer des fragments d'ADN dans un système permettant de les trier par ordre de tailles, et à les faire réagir avec des réactifs permettant la réalisation d'un couplage des groupes chimiques portés par les ribonucléotides terminaux de ceux des fragments qui en portent, avec une molécule ou un produit ayant une affinité sélective à l'égard du groupe chimique de modification desdits ribonucléotides terminaux, en vue de leur visualisation, et à déterminer les nucléotides terminaux non modifiés de chacun de ces fragments d'ADN, eu égard à la nature de l'agent chimique utilisé pour le clivage à son niveau.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR82/00223

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ¹		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC IPC ³ : C07H 21/00; C12N 15/00; G01N 33/50		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
IPC ³	C07H 21/00; C12N 15/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁶		
Category [*]	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
X	Chemical Abstracts, vol. 96, No. 7, February 15, 1982 (Columbus, Ohio, US), P.R. Langer et al.: "Enzymic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes", see page 207, column 2, ref.: 47771z, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78(11), 6633-7	1-11
Y	DE, A, 2618511 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-119	1
Y	DE, A, 2618419 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-62	1
Y	US, A, 42555566 (R.J. CARRICO et al.), 10 March 1981, see column 2, lines 50-70; columns 3, 4	1

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁴</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ¹	Date of Mailing of this International Search Report ¹	
16 March 1983 (16.03.83)	31 March 1983 (31.03.83)	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ²⁰	
European Patent Office		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 82/00223

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ¹		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB. ³: C 07 H 21/00; C 12 N 15/00; G 01 N 33/50		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁴		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB. ³:	C 07 H 21/00; C 12 N 15/00	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴		
Catégorie ⁶	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
X	Chemical Abstracts, vol. 96, no. 7, 15 février 1982 (Columbus, Ohio, US) P.R. LANGER et al.: "Enzymic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes", voir page 207, colonne 2, réf.: 47771z, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78(11), 6633-7	1-11
Y	DE, A, 2618511 (MILES) 4 novembre 1976 voir pages 34-119	1
Y	DE, A, 2618419 (MILES) 4 novembre 1976 voir pages 34-62	1
Y	US, A, 4255566 (R.J. CARRICO et al.) 10 mars 1981 voir colonne 2, lignes 50-70; colonnes 3,4	1
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁴ Catégories spéciales de documents cités: ¹⁴</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée ¹⁹ <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">16 mars 1983</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale ²⁰ <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">31 MARS 1983</div>	
Administration chargée de la recherche internationale ²¹ <div style="text-align: center; font-weight: bold;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>	Signature du fonctionnaire autorisé ²² <div style="text-align: right;"> G. L. M. Krueger </div>	